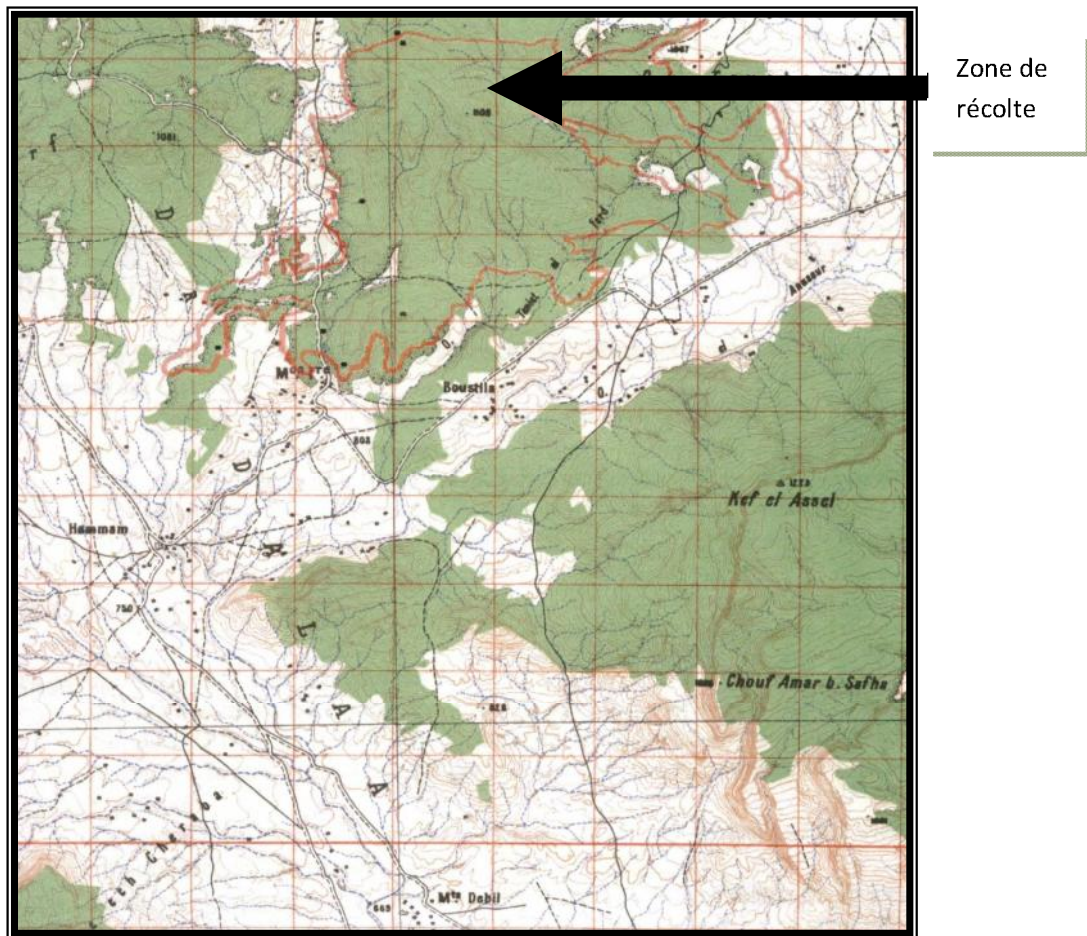


I Matériel végétal

I.1 Echantillonnage

Les échantillons de la plante (Figure 4) ont été récoltés, dans la région d'El Haurane de la commune de Hammam Dalaâ située à 15 Km de la ville de M'sila, le site de récolte étant une montagne de 1000 m de hauteur où les conditions climatiques (température, ensoleillement et précipitation) favorisent sa croissance. La récolte a été faite en fin de mai 2009 après la période de floraison dans un endroit propre et loin de la pollution.

Un spécimen herbier est déposé au niveau du département de biologie de l'université de M'sila.



Légende:


 : Limite du canton d'El Haourane

Fig .4 : Site de récolte de *Cistus libanotis* L. (région El Hourane).

I.2 Traitement préliminaire de la plante

Après récolte, les échantillons sont coupés, les racines sont éliminées de la plante. La partie aérienne (Feuilles, Fleures et Tiges) est récupérée pour servir de matière première pour l'extraction des substances polyphénoliques, et des HE.

I.3 Test d'humidité

Les échantillons représentatifs de 2 g (trois fois) sont portés à 104 °C pendant quatre H pour la mesure du taux d'Humidité dans un incubateur ventilé (Memmert).

La teneur en eau est déterminée comme suit :

$$\text{Teneur en eau \%} = \frac{m_f - m_s}{m_f} \times 100$$

m_f = Matière fraîche.

m_s = Matière sèche.

Ce paramètre est d'une importance majeure dans l'étape de séchage .

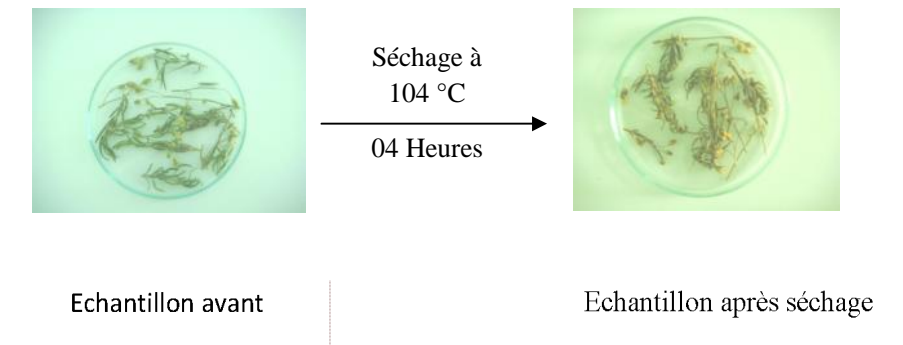


Fig.5: Test d'humidité de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L.

I.4 Séchage

Les échantillons étalés sur des supports perforés sont incubés dans un incubateur ventilé (Memmert) à 45°C avec un témoin de 2 g de la plante. Le témoin nous permet de mesurer le pourcentage d'eau perdu en comparant avec le test d'humidité. Le séchage est arrêté après une durée de 168 H.

I.5 Broyage

Les échantillons séchés sont broyés dans un premier temps dans un mortier de cuisine, après tamassage les grands débris sont éliminés pour subir en fin un broyage fin dans un broyeur (Moulinex).

La poudre fine mis dans des bocaux hermétiques et conservé à sec (température ambiante) à l'abri de l'humidité.

Le broyage de la plante permet d'obtenir de la poudre fine pour augmenter la surface de contact solvant échantillon et une meilleure infiltration du solvant au sein du matériel végétal ce qui a pour conséquence une augmentation du rendement d'extraction.

II Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Principe

Les extraits végétaux sont chauffés jusqu'à ébullition, l'HE s'évapore alors avec les vapeurs dégagées, puis est condensée (elle redevient liquide lorsqu'on la refroidit) et séparée de l'eau.

(Figure 6) cette méthode est effectuée par un hydrodistillateur (Falc).

Mode opératoire

100 g de la partie aérienne de la plante sèche est introduite dans un ballon à trois cols de un litre (Figure 6). Imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 H. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décantation, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Fig.6 : Schéma de principe d'une extraction par hydrodistillation

Après fermeture du montage et mise en marche du chauffe ballon, on s'assure que la température à l'intérieur du ballon est égale à 100 °C aide du thermomètre placé dans le col latéral du ballon.

La vapeur chargée d'HE arrive dans le condenseur. Le distillat est recueilli dans l'ampoule à décantation, l'huile est séparée de l'eau de ce distillat par décantation, après relargage au NaCl (Prolabo) et, traitement au cyclohexane (VWR Prolabo) afin d'extraire l'huile solubilisée.

L'huile est séparée de l'eau par décantation (extraction liquide-liquide) (figure 7), séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis filtré sur un filtre plissé (wattman) et en fin conservée dans des tubes à essais dans un endroit frais et obscur à l'abri de la lumière pour permettre l'évaporation de cyclohexane.

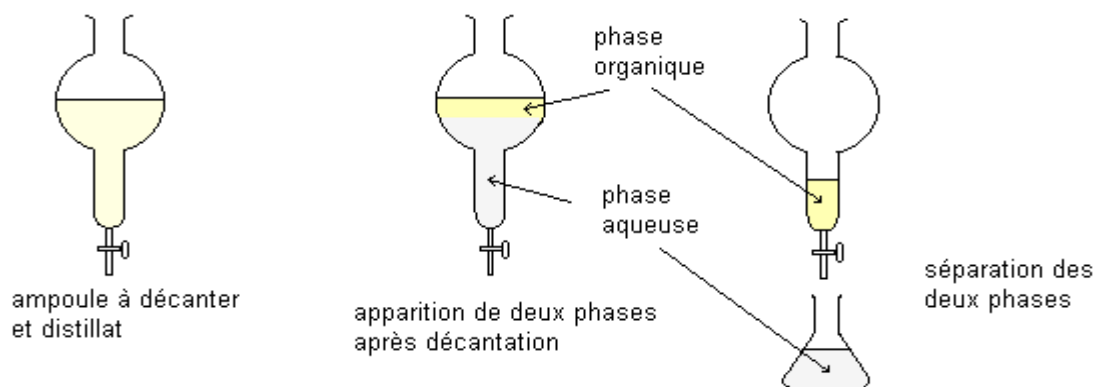


Fig.7: Extraction liquide/liquide (décantation).

La différence de poids des tubes à essai vides et ceux remplis avec de l'HE après évaporation du cyclohexane, donne la masse de l'HE.

Calcul du rendement:

Le rendement peut être exprimé de deux manières :

- Le rendement (p/p) : est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt HE} = \frac{MHE}{MVS} \times 100$$

Rdt HE: rendement en HE(%).

MHE: Masse de l'huile essentielle (g).

MVS: Masse de la matière végétale sèche.

- Le rendement (v/p) : est le rapport entre le volume d'huile extraite est le poids de plante à traiter :

$$\text{Rdt HE} = \frac{VHE}{MVS} \times 100$$

VHE: Volume d'HE (ml).

III Extraction des polyphénols

Principe

L'extraction solide/liquide est une opération de séparation qui consiste à extraire un constituant solide d'une matrice qui'en comporte plusieurs en le transférant sélectivement vers une phase liquide . (Arditti,1968; Parnier ,1979). Deux méthodes sont utilisées pour l'extraction des polyphénols .

III.1 Méthode d' Akwuah et al . (2005)

Chaque échantillon de *Cistus libanotis* L subit séparément deux extractions dans cinq solvants de polarité différente: Eau distillée, Méthanol 50%, Méthanol pur (Biochem), Acétone 70% (Biochem) et chloroforme (VWR Prolabo) pour deux périodes d'incubation de quatre et huit H (figure 8). Ces solvants sont de qualité analytique.

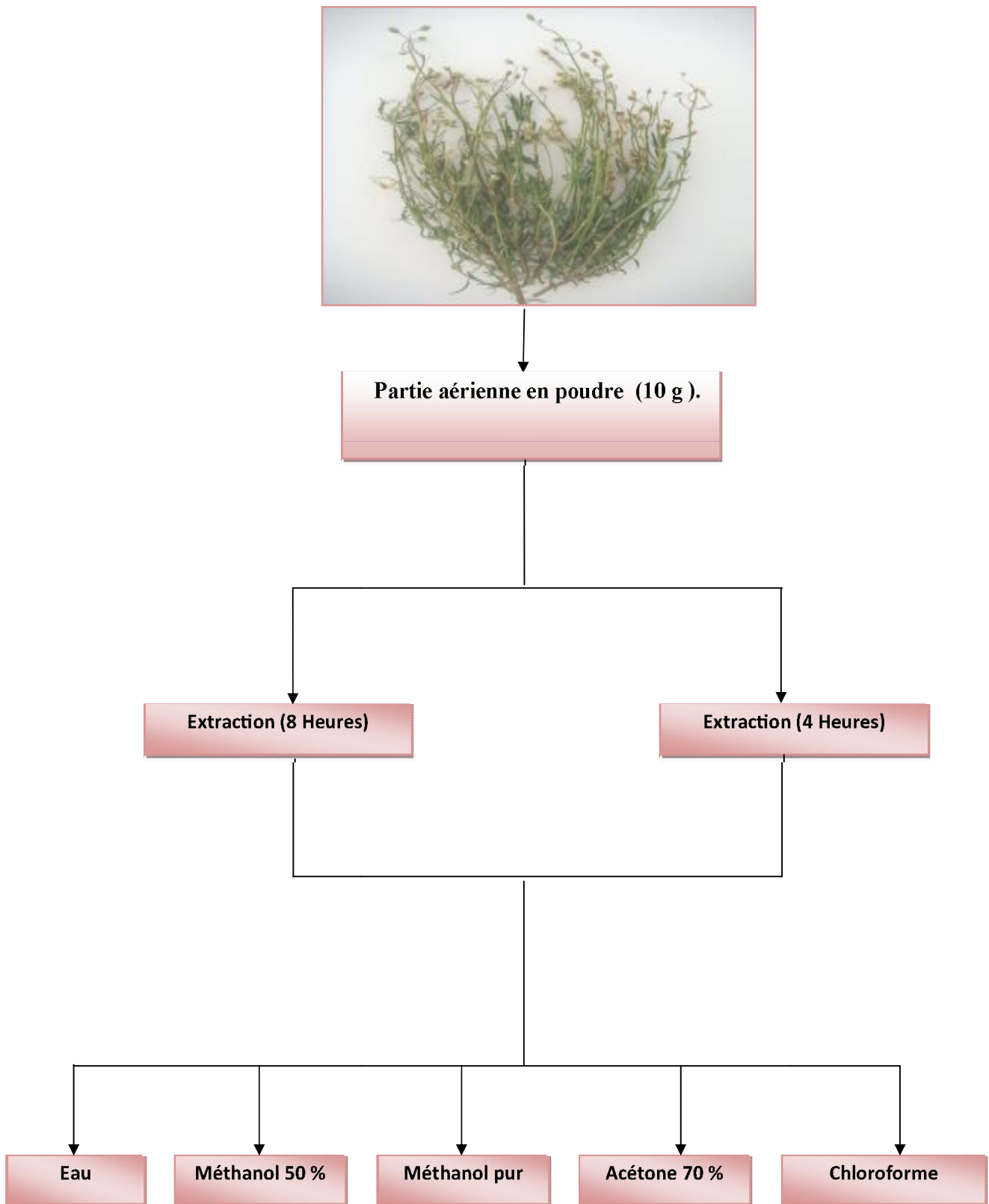


Fig .8 : Extraction des polyphénols de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L par la méthode de Akwuah et al (2005).

III.1.1 Extraction ou solubilisation

Dix grammes (10g) de l'échantillon en poudre sont pesés par une balance analytique (Scaltec) puis trempés respectivement et séparément dans 100ml d'eau distillée, méthanol 50%, Méthanol pur (Biochem), Acétone 70% (Biochem) et chloroforme (Prolabo).

Les fioles contenant les solutions d'échantillon sont incubés dans un bain marie (Mettler) à une température de 40 pendant quatre heures. la même manipulation est répétée dans les mêmes conditions avec un temps d'incubation de huit heures.

III.1.2 Filtration

Une fois que l'extraction est achevée, les échantillons sont filtrés. La filtration permet de clarifier les solutions d'échantillons et d'éliminer les particules solides issus des déchets de la plante.

- Une première filtration se fait à travers un tissu placé sur un entonnoir sur un bécher; la pâte ainsi obtenue est pressée à la main pour chasser le maximum de solvant et de solide soluble (Figure a).

-le filtrat obtenu subit Une deuxième filtration se fait à travers un papier wattman de 150 mm de diamètre de porosité 4 (Figure b)

- En fin, une troisième filtration sous vide est suivie à l'aide d'un filtre en verre fritté (porosité 4) pour éliminer toute trace de solide dans les solutions (Figure c).

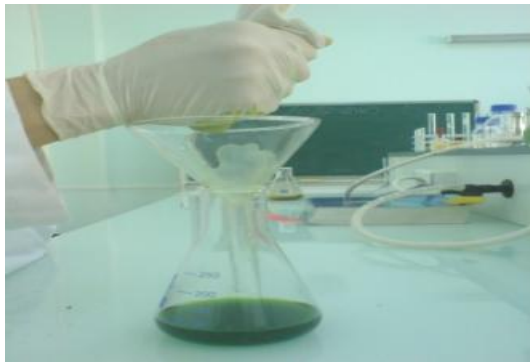


Fig.a: Filtration des extraits (à travers un tissu)



Fig.b: Filtration sur papier Wattman



Fig.c: Filtration sous vide.

Fig .9 : Les différentes étapes de filtrations.

III.1.3 Evaporation

Après filtration sous vide, les solutions obtenues, exemptes de particules solides, subissent une évaporation sous vide dans un rotavapor (Buchi 461) .(Figure .10)

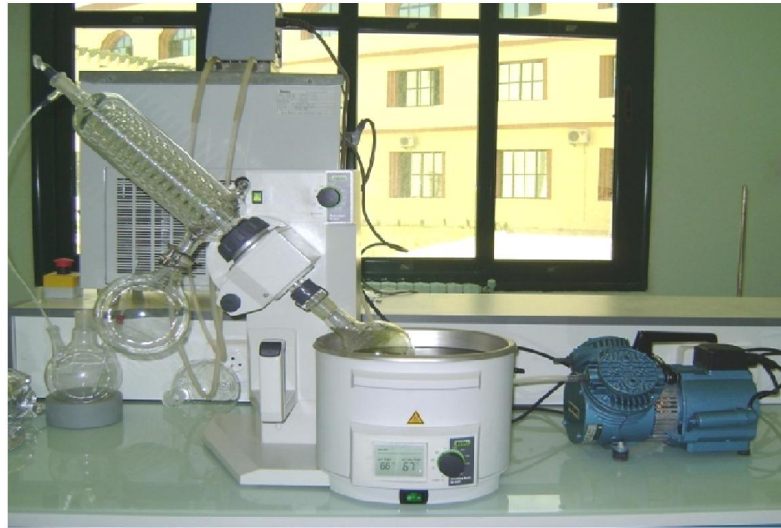


Fig.10: Evaporation des extraits par Rotavapor Buchi 461

Jusqu'à l'obtention d'extrait sec (Figure 10). Ces extraits bruts de polyphénols (EBP) sont alors récupérés et pesés avec une balance analytique.

$$\text{EBP en \%} = \frac{\text{PES}}{\text{PE}} \times 100$$

PES : Poids de l'extrait sec après évaporation

PE : poids de l'échantillon.

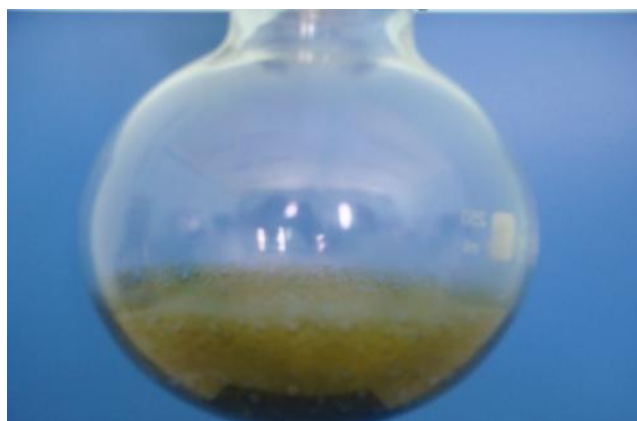


Fig.11 : Extrait polyphénolique brut (EPB) .

III.2 Méthodes d'extraction de Owen et Johns (1999)

De la grande diversité structurale des polyphénols découle d'une grande variabilité des propriétés physico-chimiques rendant une présentation unique et générale d'une méthode qui permet l'extraction et l'isolement des polyphénols .

Dans notre étude, l'extraction a été réalisée avec du Méthanol pur (99%) (Biochem).une masse de 200 mg de poudre de partie aérienne de *Cistus libanotis* L. est dissoute dans un volume de 500 ml de Méthanol pur . Le mélange est soumis à une agitation magnétique continue à l'obscurité pendant une semaine (168 H) à température ambiante (Figure 12).

Après filtration, Le filtrat obtenu est placé dans un Rotavapor (Buchi) à 55 ° C . Après évaporation totale du solvant, la pesée de l'extrait a été prise après stabilisation du poids sec de l'extrait . L' extrait obtenu est calculé comme suit:

$$\text{Calcul du taux de matière extraite (\%)} = \frac{P_1 - P_0}{E} \times 100$$

P_0 : Poids du ballon (g).

P_1 : Poids du ballon après évaporation (g)

E : Poids de l'échantillon (Poudre) (g).

200 mg de matière sèche de *Cistus libanotis* L

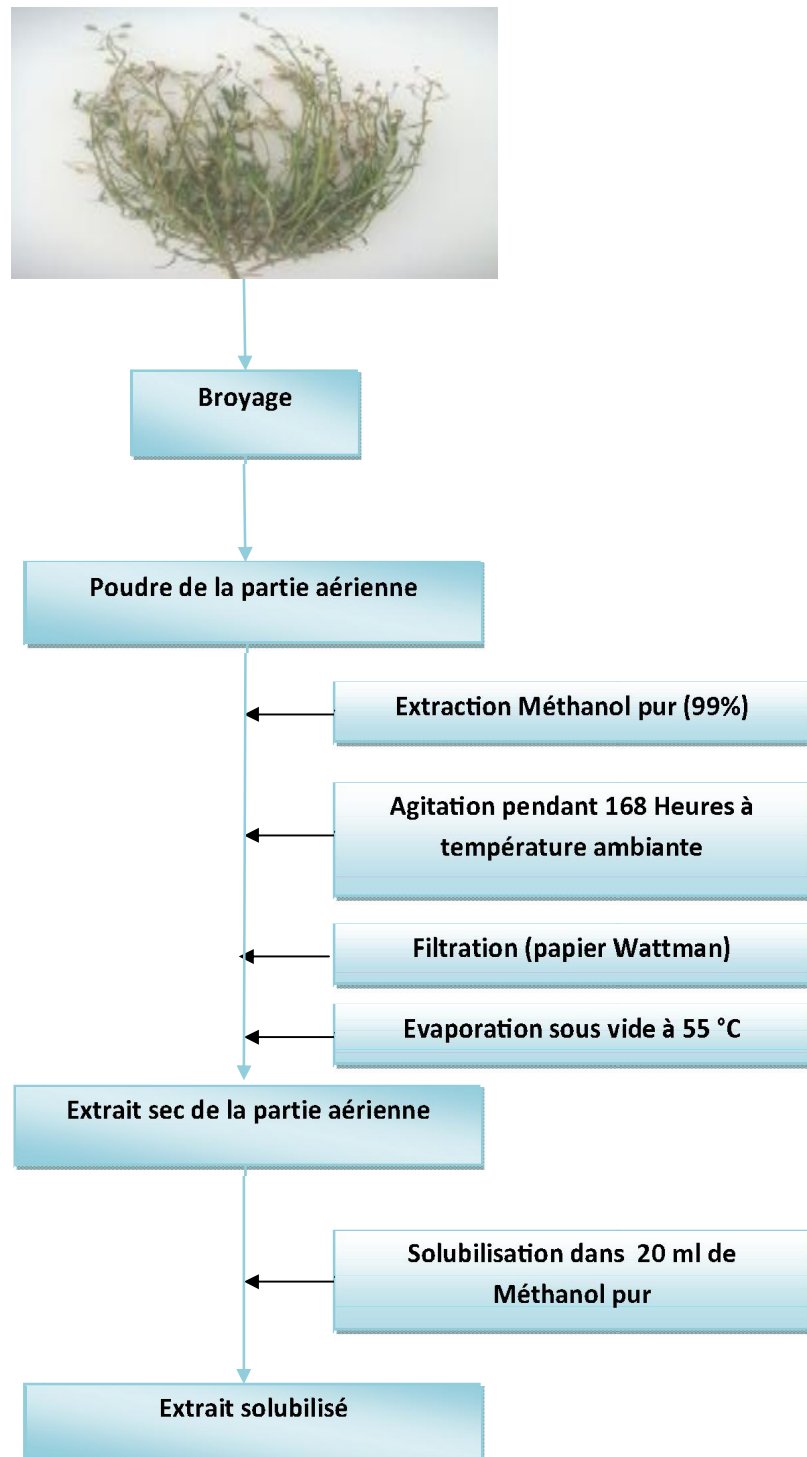


Fig.12: Extraction des polyphénols de la partie aérienne *Cistus libanotis* L. (méthode Owen et Johns ,1999)

III.3 Extraction des flavonoïdes

Le protocole d'extraction des flavonoïdes est résumé dans la figure 13. 20 g de matière sèche broyées de *Cistus libanotis* L. est mélangé avec 200 ml de Méthanol (85%). Après 24 H le mélange est filtré à travers un tissu. Ce processus est réalisé deux autres fois avec du Méthanol (85%) et deux fois avec du Méthanol 50%. Les filtrats sont combinés, filtrés sur du papier filtre (Wattman) puis soumis à une évaporation à basse pression à 35 °C (rotavapor Buchi 461), la phase aqueuse obtenue est conservée à 4 °C pendant 48 H puis filtré. Le filtrat obtenu est soumis alors à un lavage (trois fois successifs) avec du n-Hexane (Prolabo) afin d'éliminer les cires, les lipides et la chlorophylle, pour donner une phase aqueuse.

Cette phase aqueuse est mélangée à un volume égal avec du chloroforme (trois fois) pour obtenir une phase organique. La phase aqueuse restante subit une série d'extraction à l'acétate d'éthyle (Prolabo) 4 fois pour récupérer une phase organique contenant certains flavonoïdes (mono et diglycosidique). La phase aqueuse restante contient des flavonoïdes glycosilées (di, tri et tétraglycosilées).

Les extractions obtenues (3 fractions) sont soumises à une évaporation à basse pression 35 °C jusqu'à l'obtention d'extrait sec afin de calculer les rendements d'extraction.

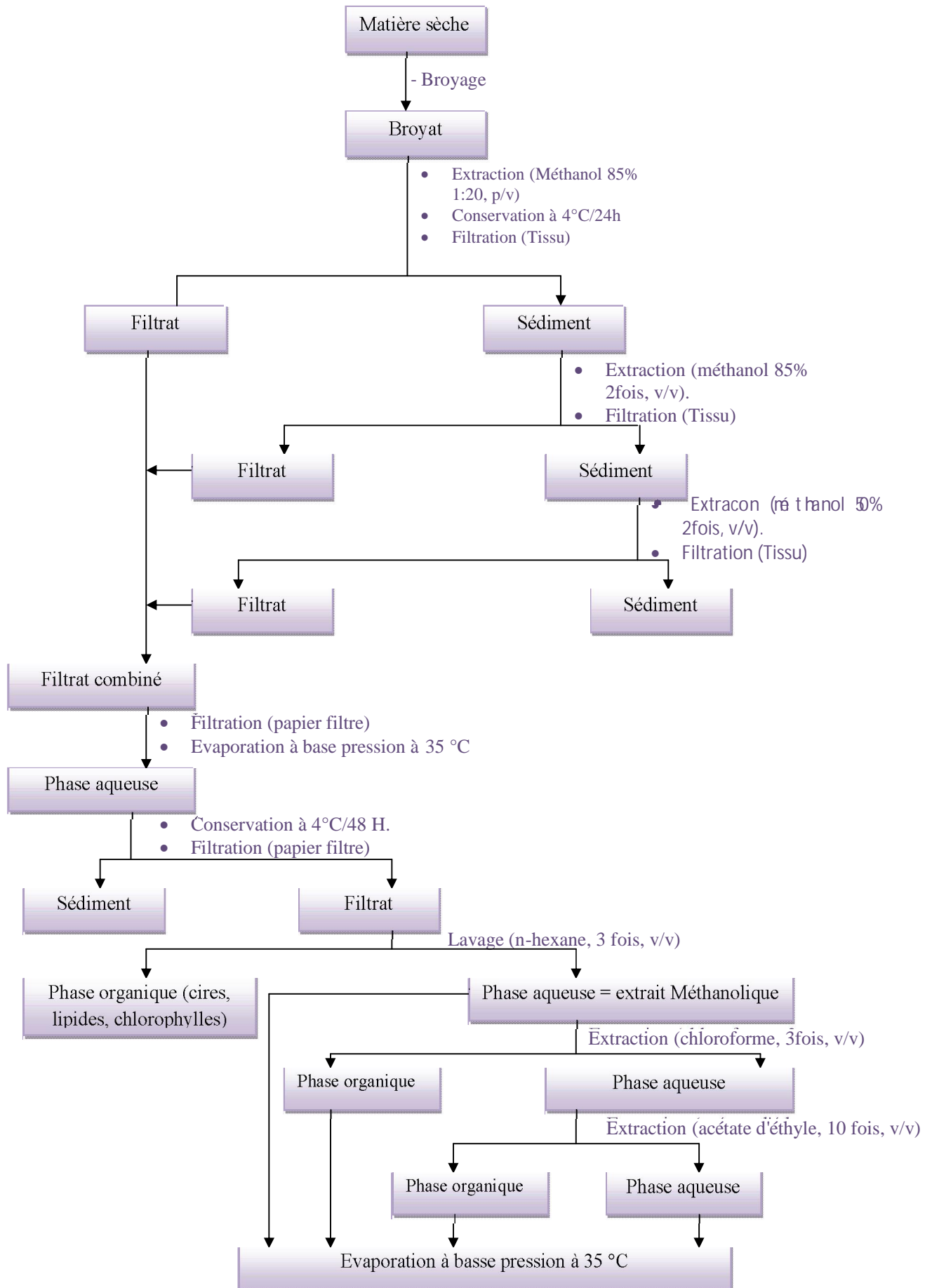


Fig.13: Schéma d'extraction des flavonoïdes (Marby et Markham 1982)

IV Tests de mise en évidence de quelques substances actives

Afin de mettre en évidence quelques substances bioactives de *Cistus libanotis* L. Les tests sont effectués sur un infusé de la plante .

Tous les essais phytochimiques que nous avons effectués s'inspirent de ceux décrits par Faugeras et Lavenir (1965).

IV.1 Préparation de l'infuser

10 g de poudre sèche de *Cistus libanotis* L sont mit à infuser dans 100 d'eau bouillante pendant 15 min . Le filtrat est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée .

IV.2 Mise en évidence

IV.2.1 Les polyphénols

Quelques gouttes d' HCl (Biochem), sont ajoutées a 5 ml d'infusé, la réaction donne une coloration rouge en présence de polyphénols (Rizk , 1982).

IV.2.2 Les Anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaques dilué au (1/2) sont ajoutées à 5ml d'infusé . la réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyanes (Rizk A.M , 1982).

IV.2.3 Les Tanins

Quelque gouttes d'une solution de $Fe Cl_3$ à 5 % sont ajoutées a 5 ml d'infusé . La réaction donne une coloration bleue noire en présence de tanins (Rizk , 1982).

IV.2.4 Les Coumarines

1 g de poudre végétal est placé dans un tube , en présence de quelques gouttes d'eau . Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé du NaOH (Fluka) dilué, et sont portés à ébullition.toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après l'examen sous UV (Rizk , 1982) .

IV.2.5 les Saponosides

15 ml de l'infusé est ajouté à 2 ml d'eau distillée, après agitation pendant 2min, laissé reposé pendant 15 min . La formation d'une mousse persistante indiq ue la présence des saponosides (Rizk, 1982).

V La séparation chromatographique des extraits méthanolique sur couche mince (CCM)

Principe

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique rapide de contrôle dont l'adsorbant ou phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme, appliquée sur un support. La phase mobile ou éluant migre à la surface de la plaque par capillarité. (Diallo, 2005).

C'est une méthode analytique de contrôle qui, à chaque stade de séparation permet de :

- Suivre l'efficacité des extractions avec différents solvants.
- Suivre la composition de différentes fractions obtenues au cours des séparations.
- Faire le meilleur choix des solvants d'élution des colonnes.
- Vérifier la pureté des produits isolés.

Mode opératoire

A) Solution à analyser:

Les extraits méthanoliques obtenus par la méthode d'Owen et Johns (1999) et celle d'Akwuah et al. (2005), (Extrait méthanol pur 99%, 8 H) sont analysés par plusieurs CCM en jouant chaque fois sur la nature du système solvant utilisé pour mettre en évidence les éventuels composés ou famille qui entrent dans la composition de *Cistus libanotis* L.

b) Dépôt

Les dépôts ont été faits avec une micro-pipette sur une plaque de CCM d'aluminium préalablement étalées par un gel de Silice (60F 254 Merck) d'une taille moyenne de 8/5 cm.

-4 dépôts ont été effectués sur la plaque de CCM à des points séparés par 1 cm et loin des bords latéraux de la plaque pour éviter l'effet de bords. Chaque extrait ainsi deux étalons (acide gallique et la quercétine) (Jensen) ont été déposés sur la plaque :

- Pour l'extrait méthanolique d'Akwuah on dépose sur la plaque 2,5 µl (un seul dépôt) car il s'agit d'un extrait concentré.
- Pour l'extrait méthanolique d'Owen et Johns, on effectue plusieurs dépôts de 2,5 µl (8 fois) avec séchage entre les dépôts, car il s'agit d'un extrait dilué.
- Pour les étalons: la quercétine et l'acide gallique, un dépôt de 2,5 µl pour chacun.

c) Migration

Les plaques sont déposées dans une cuve préalablement saturé par le système solvant, l'élution est réalisée avec plusieurs systèmes de solvants. le choix de ces systèmes est à partir de la littérature (tableau 12).

D) Révélation

Les plaques ont été séchées puis observées sous UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm. Certaines plaques sont révélées au réactif de chlolorure d'aluminium ($AlCl_3$) 2%.

Les rapports frontaux (RF) des différentes taches sont calculés.

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{frond de solvant}}$$

Tableau 12 : Les systèmes solvants utilisés dans les séparations CCM .

Les systèmes solvants		Rapport (v/v) (ml/ml)
Chloroforme /Méthanol	CM	10/2
Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau	AME	7/1.5/1.5
Acétate /n-Butanol	AB	9/1
Acétate d'ethyl/Ac acétique /Eau.	AAE	8/1/1.
Acétate d'éthyl /Ether diéthylique.	AE	2/8.
Dichlorométhane/Méthanol.	DM	5/1.
Dichlorométhane/Acétate d'éthyl	DA	9/1
Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau	AFE	8/1/1

VI Spectre UV-Visible des extraits méthanoliques

Principe

Le dosage des polyphénols utilise fréquemment leur spectre d'absorption, soit dans le visible pour les anthocyanes, soit dans l'UV pour la plupart des autres composés, en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption maximale.

Pour choisir cette longueur d'onde il faut connaître les chromophores "élémentaires" qui absorbent l'UV à des longueurs d'ondes variées.

Mode opératoire

L'extrait méthanolique dilué par (le méthanol) mis dans une cuve de quartz pour subir un balayage dans un spectrophotomètre UV-Visible UV-2401 PC (Shimadzu) de 209 à 663 nm contre un témoin méthanol.